

# FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY

## **Priority Certificate DE 101 48 732.0 Regarding the Filing of a Patent Application**

**Filing Number:** 101 48 732.0

**Date of Filing:** 02 October 2001

**Applicant/Owner:** Mologen Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH, 14195 Berlin/DE

**Title:** Genetic Vaccine against Leishmania major

**IPC:** A 61 K 39/39, C 12 N 15/63

**The attached pieces are a true and accurate copy of the documents of this patent application as filed on April 30, 2003, with the priority document of May 11, 2004, with the World Intellectual Property Organization.**

Munich, January 14, 2008  
**German Patent and Trademark Office**  
**The President**  
by proxy  
(Letang)

## Genetic Vaccine against *Leishmania major*

This application concerns a DNA expression construct for the treatment of infections with leishmania, and a corresponding vaccine.

*Leishmania* are trypanosomatide flagellates of the order Kinetoplastida. They are passed on to different mammal species and humans by female blood-feeding sandflies of the species *Phlebotomus* and *Lutzomyia*. Leishmaniases are diseases with a diverse set of clinical appearances and constitute a major health problem. According to WHO estimates, about 12 million human beings are affected by the disease world-wide. About 2 to 9 percent of all HIV patients suffer from visceral leishmaniasis, making it the third most prevalent parasitic disease afflicting HIV patients.

Chemotherapy shows only a limited effect as a treatment.

Since patients who have overcome the infection develop a strong immunity against subsequent infection, the development of an effective vaccine should be possible.

Different antigens were tested in various experimental vaccine protocols in mice. Balb/c mice are a good model for studying leishmaniasis. Important similarities exist with regard to the progression of the infection and the development of lesions between mice and men. The immunological reaction to this infection in mice seems to be similar to that in humans, and probably also to that in dogs (Cox, *Int. J. Parasitol.* 263: 1147-1157). Antigens employed were gp63 (Scott et al., *J. Exp. Med.* 168: 1675-1684), gp46 (McMahon-Pratt et al., *Infection and Immunity* 61: 3351-3359), p-4 and p-8 (Scott et al., *Immunology* 99: 615-624) and the antigen referred to as gp36 or LACK (Gonzales-Aseguinolaza et al., *Eur. J. Biochem.* 259: 909-916). LACK is a 36 kDa antigen from leishmania, which is highly conserved and found in all related species of leishmania. It is expressed both in the promastigote and amastigote, the two life stages of the parasitic life cycle in the host.

Different chemical, physical and biological methods of transfection are known in order to transfer the DNA encoding the immunogenic antigens or parts thereof.

Biological means of transfection, so-called gene shuttles, are viral vectors, plasmids or covalently closed minimalistic DNA constructs, referred to as MIDGE (MINIMALISTIC IMMUNOLOGICALLY DEFINED GENE EXPRESSION VECTORS, see EP 0 914 318 B1) in the following.

Plasmids are obtained by bacterial fermentation. Apart from the desired gene, they contain DNA necessary for their proliferation and selection, commonly resistance genes against antibiotics used in bacterial fermentation. This bacterial DNA has the disadvantage that it can contain immunostimulatory sequences ("ISS", i.e. non-methylated cytosine-guanine dinucleotides, "CpG"). This effect is specifically undesirable in immunosuppression (described in detail in DE 199 35 756). When using gene expression constructs on the basis of plasmid DNA, also the inherent risk of dissemination of antibiotic resistance genes exists, which seems especially irresponsible in the context of vaccination campaigns. For this reason, also the method of vaccination with eucaryotic expression vectors containing the leishmania specific p36 LACK antigen, suggested by Gurunathan et al. (J. Exp. Med., Vol 186, No. 7, (1997): 1137-1147), is very disadvantageous. The disadvantages of plasmid based expression vectors described above constitute an obstacle to their broad use in medical practice.

The gene transfer method most frequently used due to its great transfection efficiency is the use of viral vectors. Nonetheless the safety risks associated with their use are a hindrance to their broad application. It is known that a high risk exists that the host organism will mount a cytotoxic reaction to the transfected cells. The application of a high dose of an adenovirus led to the death of a

patient in a clinical trial; it seems that an over-reaction of the immune system was the cause of this (Lehrman, 1999, Nature 401: 517-518).

Furthermore, the reversion of an attenuated vaccine strain into a virulent strain by instability can not be excluded. Also, the viral components can be immunogenic by themselves, which leads to a decrease of their efficacy by the immune system of the patient.

Apart from these disadvantages, which originate in the deficiencies of current methods of gene transfer, it has not been possible despite all efforts to develop an effective and safe protection by vaccination against leishmania.

It is the objective of at least one possible embodiment to provide a means to enable safe, effective and protective vaccination against leishmaniasis.

The objective is attained in at least one possible embodiment described herein.

At least one embodiment is based on providing a DNA expression construct for immunization of infections by leishmania, where the immunizing polynucleotide sequences are provided in the form of expression constructs that consist of covalently closed linear deoxyribonucleotide molecules comprising a linear double stranded region, where the single strands forming the double strand are linked by a short single stranded loop consisting of deoxyribonucleotides, where said double strand forming single strands only consist of the coding sequence under control of a promoter that is operable in the

animal that is to be vaccinated, and a terminator sequence, and where the construct is linked to one or more peptides in order to enhance transfection efficiency (see EP 0 941 318 B1).

According to the prevention, the use of the immunogenic p36 LACK antigen for the provocation of an immune response is planned. A linear double stranded covalently closed expression cassette is used as gene transfer agent. This cassette consists of the coding sequence, the promoter and optional terminator sequences, so that the construct only contains the information necessary for the expression of the desired gene (see EP 0 941 318 B1). Furthermore it is provided by at least one embodiment that the DNA expression construct is covalently attached to an oligopeptide in order increase the efficacy of transfection, the oligopeptide preferably having a length of five to 25 amino acids and at least consisting by half of amino acids taken from the group of lysine and arginine. Of special preference is a nuclear localization sequence, preferably

the sequence PKKKRKV (proline - lysine - lysine - lysine - arginine - lysine - valine = Seq ID 3) comprising a nuclear localization signal (NLS) from the simian virus SV40. It was demonstrated for the SV40 NLS that proteins up to 465 kDa are directed towards the nucleus (Lanford et al. 1986, Cell 15; 46 (4): 575-82). This quality of the peptide was utilized here by

embodiment avoids the potential side effects of plasmids and recombinant virus as its decisive advantage, it can be produced more simply, more cheaply and, additionally, the inventive composition is much safer.

## Examples

### Example 1.1: Recombinant construction of the plasmid pMOKp36

2 fragments were amplified by PCR from the starter plasmid pSCp36:

1. PCR approx. 800 bp;

Primer: left 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT (= Seq ID 6),

Primer: right 5'-

TTATATGAGCTCAGAAGACACGGACAGGGACCTCTTCCGTCG (= Seq ID 7)

2. PCR approx. 950 bp;

Primer: left 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT (= Seq ID 8),

Primer: right 5'-TTATATGAGCTCTTACTCGGCCGTCGGAGATGG (= Seq ID 9)

The PCR product derived from the second PCR reaction was digested by Eco31I and the smaller fragment (approx. 200 bp) was isolated.

The PCR product from the first PCR reaction was digested with Bpil.

The 200 bp fragment and the digested fragment from the first PCR reaction were ligated and subsequently digested by KpnI and SacI, and inserted by ligation into the pMOK vector that had been digested by KpnI and SacI. The resulting plasmid was named pMOK p36. (= Seq ID 1).

### Example 1.2: Covalent attachment of the NLS sequence to oligonucleotides

Attachment of NLS was performed as follows: the NLS peptide comprising the sequence PKKKRKV was attached to the ODN in two steps. First, the modified oligonucleotide 5'-PH-dGGG AGT CCA GT xT TTC TGG AC (where xT represents an amino-modified thymine base with a C2 amino linking residue; = ODN 1 = Seq ID 4) was activated with sulfo-KMUS (5mM) in PBS at room temperature. The reaction was stopped after 120 min by adding 50 mM tris-(hydroxymethyl)-aminomethane and the activated ODN was obtained after ethanol precipitation (300mM NaOAc pH 5.2, 5.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 70% ethanol) and a single round of washing with 70% ethanol. The ODN thus obtained was dissolved in PBS at 0.1 mM and reacted with the activated peptide (0.2 mM) for one hour at room temperature. The reaction was checked by gel electrophoresis and ethidium bromide staining. The NLS-attached ODN was purified by HPLC and used for the synthesis of MIDGE p36-NLS constructs.

### Example 1.3: Production of MIDGE p36-NLS

MIDGE are linear covalently closed expression cassettes that only consist of the CMV promoter, an intron, the respective gene sequence and a polyadenylation sequence (see EP 0 941 318 B1). The constructs were obtained as follows: the plasmid pMOK p36 as described in example 1.1 was digested to completion by Eco31I. Ligation with 5' phosphorylated hairpin-shaped 5'-PH-GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC (= ODN 1 = Seq ID 4) and 5'-AGG GGT CCA GTT TTC TGG AC-3' (= ODN 2 = Seq ID 5), was achieved using T4 DNA ligase in the presence of Eco31I, and stopped by heating to 70°C. The resulting mix was concentrated and treated with Eco31I and T7 DNA polymerase in the absence of deoxyribonucleotide triphosphates. Purification was performed by anion exchange chromatography.

#### Example 1.4: determination of p36 antibody in mice

MIDGE p36-NLS, pMOKp36 and recombinant vaccinia virus p36 (rVV) were injected into female mice (Balb/c) according to the following protocol.

Table 1

group	primary immunization.	Secondary immunization (boost)
1	pMOKp36	pMOKp36
2	MIDGE p36-NLS	MIDGE p36-NLS
3	pMOK control	pMOK control
4	pMOK p36	rVV p36
5	MIDGE p36-NLS	rVV p36
7	phosphate buffer	phosphate buffer

10 mice were used per group.

Amounts of DNA were:

pMOK p36: 100 $\mu$ g, i.d.

MIDGE p36-NLS: 54.8 $\mu$ g, i.d.

rVV p36: 5x10<sup>7</sup> pfu/animal, i.p.

and were applied dissolved in sodium phosphate buffer at pH 7.2.

After 2 weeks, the secondary immunization (boost) was performed with the respective DNA construct (see table 1). Three weeks after the boost, challenge infection was performed with 5x10<sup>4</sup> leishmania major promastigotes. These were injected into the right hind paw subcutaneously. The state of infection was inspected weekly. The size of the lesions was determined using an electronic sliding calliper in comparison to the untreated left hind paw.

Eight weeks after the challenge infection, all mice were bled for sera. Determination of total IgG antibody titer against p36 and the determination of IgG 2a and IgG 1 was performed by means of ELISA, reading absorption as optical density at a wavelength of  $\lambda$  = 406 nm.

Isotope distribution of immunoglobulin gamma (IgG) for a certain antigen reflects the formation of the entire immune response again



this antigen. Thereby the IgG-1 subtypes are characteristic for a humoral response, accompanied with an elevated emission of Interleukins IL-4 IL-10 by means of activated lymphocytes; a raised level of subtype IgG 2a is typical for a cellular Th-response accompanied by an elevated emission of IFN $\gamma$  and IL-12. The appearance of the isotypes is not exclusive, however, the elevated titer can be attributed as an indicator for the dominant type of immune response received.

## Results

The surprising effect of the pharmaceutical preparation according to the invention is shown and illustrated by the Figures; where it is shown in:

Fig. 1: determination of the total IgG antibody titer before challenge infection with *Leishmania major* promastigotes. Only vaccination protocols containing a secondary immunization with recombinant vaccinia virus show a measurable antibody titer.

Fig. 2: determination of the total IgG antibody titer after challenge infection. All vaccination protocols show a measurable antibody response, whereas the highest titer of circulating antibody is provoked by MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS.

Fig. 3: ratio of the antibody isotypes IgG 2a and IgG 1 after secondary immunization and challenge infection by *L. major* Promastigotes. Surprisingly, NLS-coupled MIDGE provoked an immune response that was more cytotoxic in nature as read out from the antibody isotype distribution, and only marginally different from the response elicited by the regime pMOKp36.

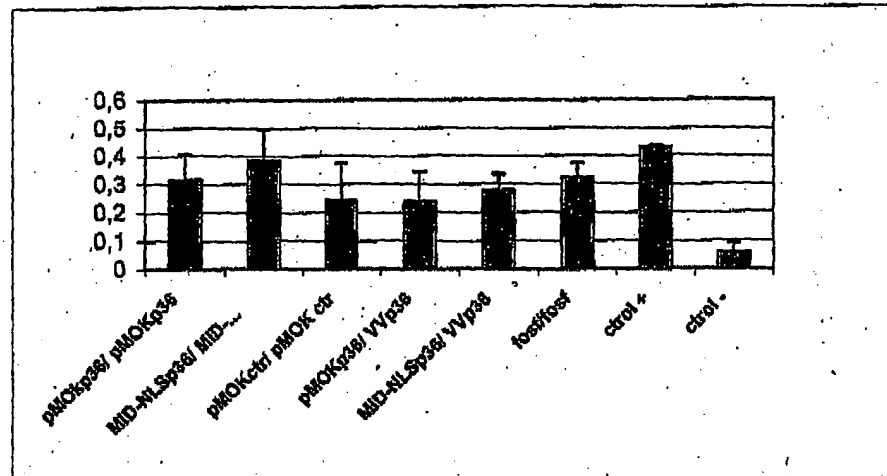
Fig.4: the development of lesion in a time frame of 8 weeks after challenge infection. Vaccination protocols based on MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS and pMOK p36/rVV p36 resulted in the longest protection against infection by *leishmania major*. Protection is

apparent by slowed development of lesions. The most efficient and longest lasting protection, however is attained in the group MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS.

## Patent Claims

1. Pharmaceutical preparation for treatment of Leishmania infections, characterized in that the preparation comprises a gene expression construct operable in eukaryotic cells and which codes for the immunogenic p36 LACK antigen under the control of a promoter sequence.
2. Pharmaceutical preparation according to claim 1, wherein the gene expressions construct is covalently coupled to an oligopeptide for the increase in transfection efficiency.
3. Pharmaceutical preparation according to claim 2 wherein the oligopetide has a length of up to 25 amino acids and at least half of the amino acids belong to the group of lysine or arginine.
4. Pharmaceutical preparation according to claim 2 wherein the oligopeptide carries a core localization sequence.
5. Pharmaceutical preparation according to claims 2 to 4, wherein the oligopeptide comprises the sequence PKKKRKV (proline-lysine-lysine-lysine-arginine-lysine-valine).
6. Pharmaceutical preparation according to claims 2-4 wherein the oligopeptide comprises the sequence YGRKKRRQRRR.
7. Pharmaceutical preparation according to one or more of the preceding claims, wherein the gene expression construct is a linear-double-stranded desoxyribonucleic acid molecule, which at each end of the double strand is covalently closed with by a short loop of single stranded nucleic residues.
8. Use of the preparation according to claim 1 to x for immunization against Leishmania.

**Fig. 1** Determination of the total IgG antibody titre



**Fig. 2** Ratio of Isotypes of IgG 2a/IgG 1

pMOKp36/pMOKp36	0.9
NLS-MIDGE/NLS-MIDGE-NLS	1.3
pMOKctr/pMOKctr	1
pMOKp36/rVp36	1.66
NLS-MIDGE/rVp36	1.35
Phosphate/Phosphate	0.96

Fig. 3

# Kinetics of Lesion Development

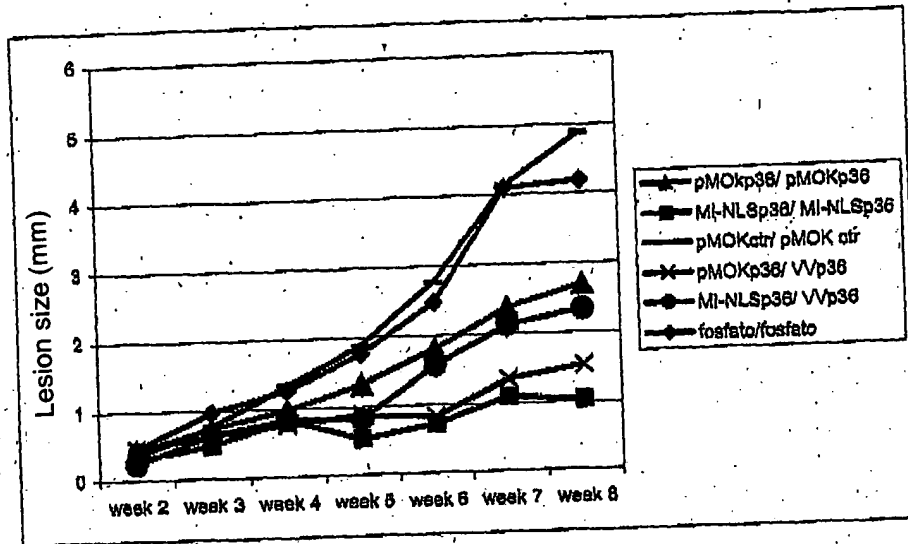
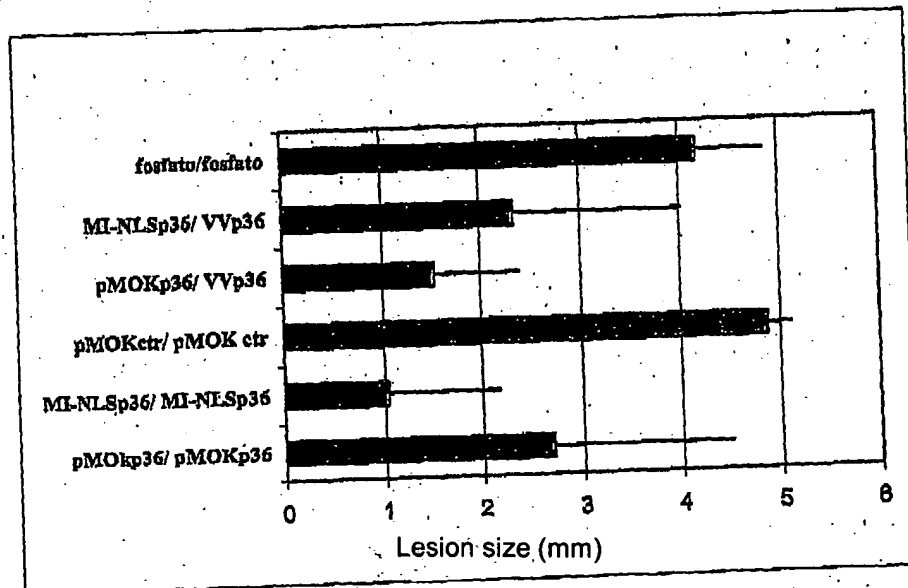


Fig. 4 Size of Lesions after load infection in week 8

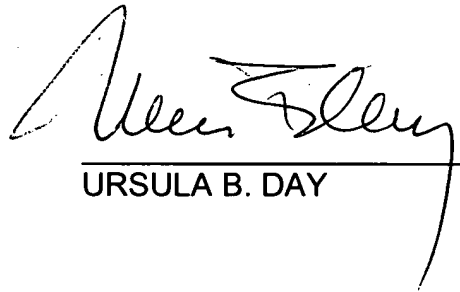


## VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, Ursula B. Day, a citizen of the United States, with a place of business at 350 Fifth Avenue, Suite 4714, New York, NY 10118, depose and state that:

1. I am familiar with the English and German languages.
2. I have read the attached German language priority document No. DE 101 48 732.0
3. The hereto attached English language text is an accurate translation thereof.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issuing thereon.



URSULA B. DAY

Date: April 3, 2008

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



## Prioritätsbescheinigung DE 101 48 732.0 über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 101 48 732.0

**Anmeldetag:** 02. Oktober 2001

**Anmelder/Inhaber:** MOLOGEN Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH, 14195 Berlin/DE

**Bezeichnung:** Genetischer Impfstoff gegen Leishmania major

**IPC:** A 61 K 39/39, C 12 N 15/63

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der am 30. April 2003 eingereichten Unterlagen dieser Patentanmeldung, hinterlegt mit dem Prioritätsbeleg vom 11. Mai 2004 bei der World Intellectual Property Organization.

München, den 14. Januar 2008  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

Letang



- 1 -

MOLOGEN Forschungs-, Entwicklungs- und Vertriebs GmbH  
Fabeckstr. 30  
14195 Berlin

XI 1335/01



### Genetischer Impfstoff gegen Leishmania major

#### Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Arzneimittel zur Immunisierung gegen Leishmaniose auf DNA-Basis.

- Leishmanien sind trypanosomatide Flagellaten aus der Ordnung Kinetoplastida, die durch weibliche blutsaugende Sandmücken der Gattung Phlebotomus und Lutzomyia auf verschiedene Säugetierspezies und auf den Menschen übertragen werden. Leishmaniosen sind Erkrankungen mit verschiedenen klinischen Krankheitsbildern, die ein bedeutendes Gesundheitsproblem darstellen. Die WHO schätzt, dass weltweit ca. 12 Millionen Menschen von der Krankheit betroffen sind. Ca. 2 bis 9% aller HIV-Patienten erkranken an visceraler Leishmaniose, damit ist dies die dritt häufigste parasitäre Krankheit, an der HIV-positive Personen erkranken.

Chemotherapie als Behandlungsmethode zeigt nur einen geringen Effekt.

#### Stand der Technik

- Da Personen, die die Infektion überstanden haben, eine starke Immunität gegen eine spätere Infektion entwickeln, sollte die Entwicklung eines wirksamen Impfschutzes möglich sein.

Verschiedene Antigene wurden in experimentellen Impfprotokollen in Mäusen getestet. Verwandte Antigene waren das gp 63 (Scott et al., J. Exp Med. 168:1675-1684),





- 2 -

- gp 48 (McMahon-Pratt et al., Infection and Immunity 61:3351-3359), p-4 und p-8 (Scott et al., Immunology 99: 615-624) sowie das p36 auch als LACK bezeichnete Antigen (Gonzales-Aseguinolaza et al., Eur. J. Biochem. 259: 909-916). LACK ist ein 36 kDa Antigen von Leishmanien, das hochkonserviert ist und in allen verwandten Leishmania Arten zu finden ist. Exprimiert wird es sowohl in der parasitären Promastigote und Amastigote, den beiden Stadien des parasitären Zyklus im Wirt.

Zum Einschleusen der die immunogenen Antigene oder Teile davon kodierenden DNA sind verschiedene chemische, physikalische und biologische Transfektionsmethoden bekannt.

- 10 Biologische Mittel zur Transfektion, sog. Genfähren, sind virale Vektoren, Plasmide oder kovalent geschlossene DNA-Konstrukte, sog. MIDGE® (MINIMALISTIC IMMUNOLOGICALLY DEFINED GENE EXPRESSION VECTORS, vgl. EP 0914 318 B1).

- 15 Plasmide werden durch bakterielle Fermentation gewonnen. Sie enthalten neben dem gewünschten Gen auch die für ihre Vervielfältigung und Selektion notwendige DNA. Diese bakterielle DNA hat den Nachteil, dass sie immunmodulierende Sequenzen (z.B. nichtmethylierte Cytosin-Guanin Dinukleotide, „CpG“) enthalten kann, die immunstimulierend wirken können. Bei Immunsuppression ist genau diese Wirkung nicht erwünscht (ausführlich beschrieben in DE 199 35 756). Bei der Verwendung von bakterieller DNA besteht zudem das Risiko der Verbreitung von Antibiotikaresistenzgenen, welches insbesondere bei Schutzimpfungskampagnen nicht vertretbar ist.

- 25 Die auf Grund ihrer hohen Transfektionseffizienz am häufigsten eingesetzten Genfähren sind virale Vektoren. Jedoch stehen die mit ihrem Einsatz verbundenen Sicherheitsrisiken einer breiten Anwendung in erheblichem Maße entgegen. Es ist bekannt, dass ein hohes Risiko einer cytotoxischen Reaktion des Wirtsorganismus auf die transfizierten Zellen besteht. So führte die Anwendung einer hohen Dosis eines Adenovirus bei einem klinischen Versuch zum Tod des Patienten. Offensichtlich war die Ursache dafür eine starke Überreaktion des Immunsystems (Lehrman, 30 1999, Nature 401:517-518). Weiterhin ist durch Instabilität des attenuierten Impfstammes die Rückverwandlung in einen virulenten Stamm nicht auszuschließen.

- 3 -

Außerdem können die viralen Bestandteile selbst Immunogen wirken, was zu einer Herabsetzung ihrer Wirksamkeit durch das Immunsystem des Patienten führt.

Neben diesen Nachteilen, die durch die bisherigen Gentransfer-Methoden bedingt sind, ist es bisher trotz aller Bemühungen noch nicht gelungen, einen effektiven und sicheren Impfschutz gegen Leishmaniose zu entwickeln.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, Mittel und Verfahren zur Verfügung zu stellen, die ein sicheres, effektives und schützendes Impfen gegen Leishmaniose ermöglichen.

Die Aufgabe wird gelöst, indem das Immunogene p36 LACK Antigen zur Erzeugung einer Immunantwort benutzt wird. Als Genfähre wird eine kovalent geschlossene Expressionskassette, der sog. MIDGE, verwendet. Die MIDGE bestehen aus der codierenden Sequenz, dem Promotor und gegebenenfalls Terminationssequenzen, so dass die Konstrukte nur die für die Expression des gewünschten Genen notwendigen Informationen enthalten (vgl. EP 0 941 318 B1).

Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurde versucht, verschiedene Peptide und andere organische Moleküle an die MIDGE kovalent zu koppeln. So ist es gelungen durch kovalente Kopplung des Kernlokalisationssignal (NLS) aus dem SV 40 Virus, an für HbsAg kodierende MIDGE, einen 10- bis 15-fach erhöhter Antikörpertiter nach intramuskulärer Applikation nachgewiesen (Schirmbeck et al., J. Mol Med. 2001 Jun;79 (5-6):343-50).

Weitere vorteilhafte Maßnahmen sind in den übrigen Unteransprüchen enthalten. Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen und Figuren näher beschrieben.

#### Ausführungsbeispiele

Beispiel 1.1: Klonierung des Plasmids pMOKp36

Vom Ausgangsplasmid pSCp36 wurden 2 Fragmente mittels PCR amplifiziert:

- 4 -

1. PCR ca. 800 bp;

Primer: links 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT,

Primer: rechts 5'-TTATATGAGCTCAGAAGACACGGACAGGGACCTCTTCCGTCG

2. PCR ca. 950 bp;

5 Primer: links 5'-TTATATGGTACCATGAACATACGAGGGTCACCT,

Primer: rechts 5'-TTATATGAGCTCTTACTCGGCCGTCGGAGATGG

Das PCR-Produkt aus der 2. PCR wurde mit Eco31I geschnitten und das kleinere Fragment (ca. 200 bp) isoliert.

Das PCR-Produkt aus der 1. PCR wurde mit BpII geschnitten.

- 10 Das 200 bp Fragment und das geschnittene Fragment aus der 1. PCR wurden zusammenligiert und anschließend mit KpnI und SacI geschnitten und in den mit KpnI und SacI geschnittenen pMOK-Vektor ligiert.

#### Beispiel 1.2: Kopplung der NLS Sequenz an Oligonukleotide

- 15 Die NLS Kopplung wurden wie folgt vorgenommen: das NLS Peptid mit der Sequenz PKKKRKV wurde in zwei Schritten an die ODN's gekoppelt. Zuerst wurde das modifizierte Oligonukleotid 5'-PH-d(GGGAGTCCAGT xT TTCTGGAC, wobei xT steht für aminomodifizierte Thyminebase mit C<sub>2</sub> - Aminolinker (0,1mM) mit sulfo-KMUS (5mM) in PBS bei Raumtemperatur (RT) aktiviert. Nach 120 min. wurde die Reaktion mit 50 mM Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane gestoppt und das aktivierte ODN nach Ethanolpräzipitation (300mM NaOAc pH 5,2, 5,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 70 % Ethanol), Zentrifugation und einmaligem Waschen mit 70% Ethanol erhalten. Das so
- 20 erhaltene ODN (0,1mM) wurde in PBS gelöst und reagierte mit dem Peptid (0,2mM) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch Gelelektrophorese (3%) und Ethidiumbromidfärbung überprüft. Das entstandene NLS gekoppelte ODN

- 5 -

wurde durch HPLC aufgereinigt und zur Synthese der MIDGE p36-NLS Konstrukte verwendet.

### Beispiel 1.3: Herstellung der MIDGE p36-NLS

- 5 MIDGE sind lineare, kovalent geschlossene Expressionskassetten, die lediglich aus dem CMV Promotor, einem Intron, der entsprechenden Gensequenz und einer Polyadenylierungssequenz bestehen (vgl. EP 0 941 318 B1). Die Konstrukte wurden wie folgt erhalten: das unter Beispiel 1.1 beschriebene Plasmid pMOKp36 wurde mit Eco 311 vollständig verdaut. Die Ligation mit 5' phosphorylierten haarnadelförmigen Oligodesoxynukleotiden (ODN) 5'-AGGGGTCCAG-TTTTCTGGAC-3' und 5'-PH-  
10 GGG AGT CCA GT XT TTC TGG AC durch T4 DNA Ligase in Anwesenheit von Eco 311 wurde durch Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Das resultierende Gemisch wurde konzentriert und mit Eco 311 und T7 DNA Ligase in Abwesenheit von Deoxyribonukleotid-Triphosphaten behandelt. Die Aufreinigung erfolgte durch Anionenaustauschchromatographie.

### 15 Beispiel 1.4: p36 Antikörperbestimmung in Mäusen

MIDGE p36-NLS, pMOKp36 und rekombinanter Vaccinia Virus p36 (VVr) wurden in weibliche (Balb/c) Mäuse nach folgendem Impfregime injiziert.

Tabelle 1

Gruppen	1. Impfung (prime)	2. Impfung (boost)
1	pMOKp36	pMOKp36
2	MIDGE p36-NLS	MIDGE p36-NLS
3	pMOK Kontrolle	pMOK Kontrolle
4	pMOKp36	VVp36
5	MIDGE p36-NLS	VVp36
7	Phosphatpuffer	Phosphatpuffer

Je Gruppe wurden 10 Mäuse eingesetzt.

- 6 -

Die verwendeten DNA Konzentrationen betrugen für:

pMOKp36: 100 µg, i.d.  
MIDGE p36-NLS: 54,8 µg, i.d.  
VVr p36:  $5 \times 10^7$  pfu/Maus, i.p.

- 5 und wurden in Natriumphosphatpuffer pH 7,2 gelöst, verabreicht.

Nach 2 Wochen erfolgte die 2. Impfung (boost) mit den entsprechenden (s. Tabelle 1) DNA Konstrukten. Drei Wochen nach dem boost, erfolgte die Belastungsinfektion mit  $5 \times 10^4$  Leishmania major Promastigoten. Diese wurden den Mäusen in die rechte Hinterpfote s.c. injiziert. Der Stand der Infektion wurde wöchentlich verfolgt. Die Größe der Läsionen wurde mit einer elektronischen Schiebelehre durch Vergleich mit der linken unbehandelten Hinterpfote bestimmt. ✓

Acht Wochen nach der Belastungsinfektion wurden von allen Mäusen die Seren gewonnen. Der Gesamt IgG Antikörpertiter gegen das p36 Antigen und die Bestimmung der IgG 2a und IgG 1 Antikörper, erfolgte mittels ELISA, wobei die Absorption in OD (Optische Dichte) bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 405$  nm bestimmt wurde. Die Isotopenverteilung von Immunglobulin gamma (IgG) für ein bestimmtes Antigen spiegelt die Ausprägung der gesamten Immunantwort gegen dieses Antigen wider. Dabei sind IgG -1 Subtypen charakteristisch für eine humorale Antwort, begleitet von einer verstärkten Ausschüttung von Interleukinen IL-4 und IL-10 durch aktivierte Lymphozyten; ein erhöhter Spiegel von Subtyp IgG 2a ist typisch für eine zelluläre Th1-Antwort, begleitet von erhöhter Ausschüttung von IFNg und IL-12. Das Auftreten der Isotypen ist dabei nicht exklusiv, die relativen Titer können jedoch als Indikator für die dominante Art der entstandenen Immunantwort gewertet werden.

#### Ergebnisse

- 25 Die überraschende Wirkung des erfindungsgemäßen Arzneimittels wird anhand der Darstellen gem. der Figuren deutlich; es zeigt:

Fig. 1: die Bestimmung des Gesamt IgG Titers. Dabei zeigen MIDGE p36-NLS im Impfreime; MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS im Vergleich den höchsten Antikörpertiter.

- 7 -

Fig. 2: das Verhältnis der Antikörper-Isotypen Verteilung IgG 2a und IgG 1. Hier zeigt sich, daß die Kombination MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS in dem Effekt der Auslösung einer zellulären (Th1) Immunantwort, sich von der durch pMOKp36/VVp36 ausgelösten, nur um wenige Größenunterschiede unterscheidet.

5

Fig. 3: die Entwicklung der Läsionen in einem Zeitraum von 8 Wochen nach der Belastungsinfektion. Dabei zeigen fast 80% aller mit MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS geimpften Mäuse eine Verkleinerung der Läsionen im Vergleich zu allen Gruppen. Bemerkenswerterweise auch zu der mit pMOKp36/VVp36 geimpften Gruppe.

10

Fig. 4: die Größe der Läsionen nach Woche 8. Den größten Schutzerfolg gegen L. major zeigen die Impfprotokolle basierend auf MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS und pMOKp36/VVp36. Der langanhaltendsten Schutz wird jedoch durch MIDGE p36-NLS/MIDGE p36-NLS erreicht.

15

- 1 -

**Patentansprüche**

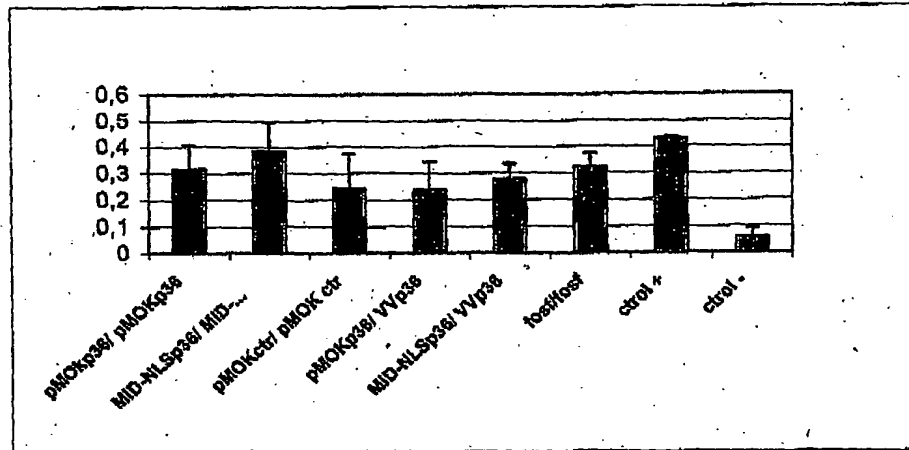
- 5 1. Arzneimittel zur Behandlung von Leishmaniose-Infektionen, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel ein in eukaryoten Zellen operables Genexpressionskonstrukt enthält, welches für das immunogene p36 LACK Antigen unter Kontrolle einer Promotersequenz kodiert.
- 10 2. Arzneimittel nach Anspruch 1, wobei das Genexpressionskonstrukt zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit einem Oligopeptid kovalent verbunden ist.
3. Arzneimittel nach Anspruch 2, wobei das Oligopeptid eine Länge von fünf bis 25 Aminosäuren hat und mindestens die Hälfte der Aminosäuren zu der Gruppe Lysin oder Arginin gehören.
- 15 4. Arzneimittel nach Anspruch 2, wobei das Oligopeptid eine Kernlokalisationssequenz trägt.
5. Arzneimittel nach den Ansprüchen 2 bis 4, wobei das Oligopeptid die Sequenz PKKKRKV (Prolin-Lysin-Lysin-Lysin-Arginin-Lysin-Valin) enthält.
- 20 6. Arzneimittel nach den Ansprüchen 2 bis 4, wobei das Oligopeptid die Sequenz YGRKKRRQRRR enthält.
- 25 7. Arzneimittel nach einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Genexpressionskonstrukt ein linear-doppelsträngiges Desoxyribonukleinsäuremolekül ist, welches an beiden Enden des Doppelstrangs durch eine kurze Schleife einzelsträngiger Nukleosidreste kovalent geschlossen ist.

- 2 -

8. Verwendung des Mittels nach Anspruch 1 bis x zur Immunisierung gegen Leishmaniose.



**Fig. 1** Bestimmung des Gesamt IgG Antikörpertiter



**Fig. 2** Verhältnis der Isotypen IgG 2a/IgG 1

pMOKp36/pMOKp36	0.9
NLS-MIDGE/NLS-MIDGE-NLS	1.3
pMOKctr/pMOKctr	1
pMOKp36/rVp36	1.66
NLS-MIDGE/rVp36	1.35
Phosphate/Phosphate	0.96

- 2/2 -

Fig. 3

Kinetik der Läsionsentwicklung

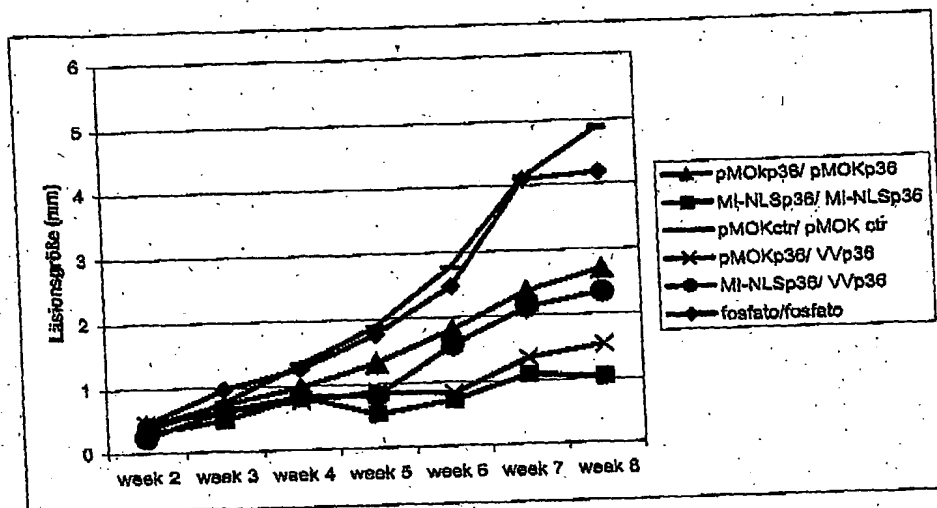


Fig. 4 Größe der Läsionen nach der Belastungsinfektion in Woche 8

